植 物 分 类 与 资 源 学 报 2011, 33 (6): 674 ~ 682
Plant Diversity and Resources DOI: 10.3724/SP. J. 1143. 2011. 11060

蒟蒻薯属（薯蓣科）植物 DNA 条形码研究*

赵月梅[1,2]，张 玲[1**]
（1 中国科学院西双版纳热带植物园，云南 勐腊 666303；2 中国科学院研究生院，北京 100049）

摘要：蒟蒻薯属（*Tacca*）植物种间在形态上差别不大，导致分类上存在一定的困难。DNA 条形码是一种利用短的 DNA 标准片段来鉴别和发现物种的方法。本研究利用核基因 ITS 片段和叶绿体基因 *trn*H-*psb*A，*rbc*L，*mat*K 片段对蒟蒻薯属 6 个种的 DNA 条形码进行研究，对 4 个 DNA 片段可用性，种内种间变异，barcode gap 进行了分析，采用 Tree-based 和 BBA 两种方法比较不同序列的鉴定能力。结果显示：单片段 ITS 正确鉴定率最高，片段组合 *rbc*L+*mat*K 正确鉴定率最高。支持 CBOL 植物工作组推荐的条码组合 *rbc*L+*mat*K 可作为蒟蒻薯属物种鉴定的标准条码，建议 ITS 片段作为候选条码。丝须蒟蒻薯 *Tacca integrifolia* 采自西藏的居群与马来西亚居群形成了 2 个不同的遗传分支，且两者在形态上也存在一定的差异，很可能是一个新种。

关键词：蒟蒻薯属；DNA 条形码；ITS；*mat*K；*rbc*L；*trn*H-*psb*A
中图分类号：Q 75，Q 949 **文献标识码**：A **文章编号**：2095-0845(2011)06-674-09

Using DNA Barcoding in Genus *Tacca* (Dioscoreaceae)

ZHAO Yue-Mei[1,2], ZHANG Ling[1**]
(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Mengla 666303, China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: *Tacca* (Dioscoreaceae) is a small genus which is taxonomically difficult because of a lack of obvious morphologically differences among species. DNA barcoding is a new method of rapid species identification and discovery using short, standardized genes or DNA regions. In this study, four candidate DNA barcoding regions that three (*rbc*L, *mat*K, *trn*H-*psb*A) from chloroplast genome and one (ITS) from the nuclear genome, were evaluated among 36 accessions representing 6 species of *Tacca*. The capability of those regions were evaluated by intra- and inter-specific divergence and barcode gap analyses, and the identification efficiency was assessed using Tree-based and BBA methods. The results indicated that both ITS and the core barcode *rbc*L+*mat*K proposed by CBOL exhibited the highest resolution as a single and combined data respectively. Based on overall performance: *mat*K+*rbc*L can be considered as a potential barcode for identifying the species of *Tacca*, ITS can be used as a supplementary barcode. DNA barcoding revealed two distinct lineages of *T. integrifolia* distributed allopatrically in Tibet and Malaysia. And these two lineages with morphological variations may potentially represent new species.

Key words: *Tacca*; DNA barcoding; ITS; *mat*K; *rbc*L; *trn*H-*psb*A

蒟蒻薯属（*Tacca*）属于薯蓣科（Dioscoreaceae），全世界约有 10 种，中国有 6 种（Drenth，1972；张玲，2006）。该属皆为草本，属泛热带分布型，分布于印度-马来地区及中南半岛，向南延至印度尼西亚诸岛，向北延至我国西南、华南地区，个别种分布到澳洲、非洲（*T. leontope-*

* 基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-YW-Z-0904）和中国科学院大科学装置工程项目（2009-LSF-GBOWS-01）
** 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：zhangl@xtbg.org.cn
收稿日期：2011-04-11，2011-07-05 接受发表
作者简介：赵月梅（1982-）女，在读研究生，主要从事植物群体遗传学研究。E-mail：yezi19820320@yahoo.com.cn

taloides），或特产于南美热带（*T. parkeri*）（Drenth，1972）。蒟蒻薯属植物花的形态奇特，大苞片包围着聚伞状的伞形花序，并有许多长须状的小苞片，这些特征使得它们在花卉园艺贸易中广受青睐。蒟蒻薯属植物根茎入药，性凉味苦，能清热解毒，消炎止痛，主治胃及十二指肠溃疡、高血压、肝炎、胃痛、烫伤烧伤、疮疡等，具有潜在的药用价值（贾敏如和李星炜，2005）。由于蒟蒻薯属植物潜在的药用价值及生境破碎化、片段化，使得该类植物居群数量日渐缩小，许多种已近濒危，大都被列为稀有保护植物（傅立国和金鉴明，1992）。

蒟蒻薯属植物的系统学位置和分类标准一直争议很大（Drenth，1972；Grierson 和 Green，1996；凌萍萍，1985），直到 2003 年 APG II 分类系统将本属置于薯蓣科中才确定了其系统位置（APG II，2003）。由于该属植物分布范围广，不同地区形态上有很大差异，经常造成该属分类学上的混乱。另外，如老虎须（*T. chantrieri*），扇苞蒟蒻薯（*T. subflabellata*）和实果蒟蒻薯（*T. ampliplacenta*）等在营养体阶段也很难区分，因此果实、气孔、染色体等曾一度作为标准进行分类（凌萍萍，1985）。鉴于形态鉴定在分类上的局限性（Knowlton，1993；Jarman 和 Elliott，2000），目前迫切需要一种既快速又能弥补形态鉴定的缺陷的方法。

2002 年，Tautz 等（2002）首先提出将 DNA 序列用于分类学研究，即利用一段标准的 DNA 序列作为标记来实现对物种的快速准确的鉴定，随后，Hebert 等（2003）正式提出了 DNA 条形码的概念，并利用线粒体的 COI 基因序列对动物界的条形码分类进行了研究。由于植物线粒体进化速度慢和核基因的多拷贝等原因，植物的 DNA 条形码多从叶绿体基因组中选择（Chase 等，2005；Cowan 等，2006）。植物条形码片段的筛选受到各种因素的制约，例如引物通用性，扩增和测序的难易以及某片段在特定植物中可能存在缺失等，不同的学者提出了不同的片段组合（Chase 等，2007；Kress 和 Erickson，2007；Lahaye 等，2008），如 ITS+*trn*H-*psb*A（Kress 等，2005），*mat*K+*atp*F-*atp*H+*psb*K-*psb*I 和 *mat*K+*atp*F-*atp*H+*trn*H-*psb*A 两个组合（Kim unpublished，2007）。CBOL 植物工作组（2009）提出了 *rbc*L+*mat*K 片段组合作为陆地植物的核心条形码。

本研究以蒟蒻薯属的 6 个种的 36 个个体为材料，对四个 DNA 条形码片段 ITS、*mat*K、*rbc*L 和 *trn*H-*psb*A 的效用进行评价，并尝试筛选出适用于该属植物物种鉴定的的 DNA 条形码片段或片段组合，为该属植物的数字化鉴定及物种保护提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　研究材料

本研究选取了蒟蒻薯属 6 个种的 36 个个体为材料，每个种包括了 2～8 个个体，材料信息见表 1。实验材料均为野外采集后经硅胶快速干燥的叶片以备 DNA 的提取。凭证标本分别存放于中国科学院西双版纳热带植物园标本馆（HITBC），中国科学院昆明植物研究所标本馆（KUN）和美国国家标本馆（NMNH）。

1.2　研究方法

DNA 提取采用 CTAB 法提取全基因组 DNA（Doyle 和 Doyle，1987），将 DNA 溶于 TE 溶液中，终浓度大约为 50 ng·uL^{-1}。PCR 扩增反应在 PERKIN ELMER（PE）9700 型 PCR 仪上进行。本研究中各 DNA 片段使用的 PCR 扩增和测序引物相同（表 2）。*mat*K、*trn*H-*psb*A 和 *rbc*L 三个叶绿体片段扩增反应程序均采用：97℃ 预变性 3 min，94℃ 变性 1 min，52℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 1 min，32 个循环后，72℃ 延伸 10 min；ITS 片段扩增反应程序采用：97℃ 预变性 3 min，95℃ 变性 2 min，54℃ 退火 1.5 min，72℃ 延伸 1 min。32 个循环后，72℃ 延伸 7 min。扩增反应采用 20 μL 的反应体系：包括 30～60 ng 的模板 DNA，2 μL 10×buffer，0.5 单位的 Taq DNA 聚合酶（5 U·μL^{-1}），1.5 μL 的 $MgCl_2$（25 mmol·L^{-1}），1.5 μL 的 dNTPs（10 mmol·L^{-1}），正反向引物各 2 μL（5 μmol·L^{-1}），再添加蒸馏水至 20 μL。扩增得到的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后，用上海生物工程技术服务有限公司的纯化试剂盒纯化并测序。为保证序列的准确性，所有片段均采用双向测序。

由于裂叶蒟蒻薯的 ITS 片段使用引物 ITS4/ITS5 时 PCR 扩增失败，所以我们也使用了 ITS1 替代 ITS5 用于 PCR 扩增（表 2）。

1.3　数据分析

用 Contigexpress（version 10.1，Invitrogen）进行序列的拼接，拼接好的序列用 Clustal X2.0（Larkin 等，2007）进行序列的比对并进行人工校正。将 4 个片段的 DNA 数据进行单独及联合构建矩阵，联合矩阵中去除序列不足的个体。

表 1　采样信息表

Table 1　Samples for testing potential barcodes

Taxa	Locality	Voucher	Code	Taxa	Locality	Voucher	Code
水田七 *Tacca plantaginea*				实果蒟蒻薯 *T. ampliplacenta*			
1	广西桂林 Guilin Guangxi	XTBGZL001	*T. plantaginea* 001	1	云南盈江 Yingjiang Yunnan	XTBGZL039	*T. ampliplacenta* 039
2	广西桂林 Guilin Guangxi	XTBGZL002	*T. plantaginea* 002	2	云南盈江 Yingjiang Yunnan	XTBGZL040	*T. ampliplacenta* 040
3	广西全州 Quanzhou Guangxi	XTBGZL005	*T. plantaginea* 005	3	云南芒市 Mangshi Yunnan	XTBGZL043	*T. ampliplacenta* 043
4	广西全州 Quanzhou Guangxi	XTBGZL006	*T. plantaginea* 006	4	云南潞西 Luxi Yunnan	XTBGZL044	*T. ampliplacenta* 044
5	贵州荔波 Libo Guizhou	XTBGZL009	*T. plantaginea* 009	老虎须 *T. chantrieri*			
6	贵州荔波 Libo Guizhou	XTBGZL010	*T. plantaginea* 010	1	云南盈江 Yingjiang Yunnan	XTBGZL037	*T. chantrieri* 037
裂叶蒟蒻薯 *T. leontopetaloides*				2	云南盈江 Yingjiang Yunnan	XTBGZL040	*T. chantrieri* 040
1	云南勐腊 Mengla Yunnan	XTBGZL003	*T. leontopetaloides* 003	3	广西宣州 Xuanzhou Guangxi	XTBGZL048	*T. chantrieri* 048
2	云南勐腊 Mengla Yunnan	XTBGZL004	*T. leontopetaloides* 004	4	云南普洱 Pu’er Yunnan	XTBGZL049	*T. chantrieri* 049
3	泰国清迈 Chiang mai Thailand	XTBGZL015	*T. leontopetaloides* 015	5	云南勐腊 Mengla Yunnan	XTBGZL050	*T. chantrieri* 050
4	泰国清迈 Chiang mai Thailand	XTBGZL016	*T. leontopetaloides* 016	6	云南勐腊 Mengla Yunnan	XTBGZL051	*T. chantrieri* 051
5	马达加斯加 Madagascar	XTBGZL017	*T. leontopetaloides* 017	7	云南马关 Maguan Yunnan	XTBGZL052	*T. chantrieri* 052
6	马达加斯加 Madagascar	XTBGZL018	*T. leontopetaloides* 018	8	云南马关 Maguan Yunnan	XTBGZL053	*T. chantrieri* 053
7	美国夏威夷 Hawaii USA	XTBGZL020	*T. leontopetaloides* 020	丝须蒟蒻薯 *T. integrifolia*			
8	美国夏威夷 Hawaii USA	XTBGZL021	*T. leontopetaloides* 021	1	马来西亚芙蓉市 Seremban Malaysia	XTBGZL022	*T. integrifolia* 022
扇苞蒟蒻薯 *T. subflabellata*				2	马来西亚芙蓉市 Seremban Malaysia	XTBGZL023	*T. integrifolia* 023
1	云南河口 Hekou Yunnan	XTBGZL011	*T. subflabellata* 011	3	马来西亚芙蓉市 Seremban Malaysia	XTBGZL024	*T. integrifolia* 024
2	云南河口 Hekou Yunnan	XTBGZL012	*T. subflabellata* 012	4	西藏墨脱背崩 Beibeng Motuo Tibet	XTBGZL029	*T. integrifolia* 029
3	越南老街 Laocai Vietnam	XTBGZL013	*T. subflabellata* 013	5	西藏墨脱背崩 Beibeng Motuo Tibet	XTBGZL030	*T. integrifolia* 030
4	越南老街 Laocai Vietnam	XTBGZL014	*T. subflabellata* 014	6	西藏墨脱汗密 Hanmi Motuo Tibet	XTBGZL007	*T. integrifolia* 007

表 2　四个片段的引物信息表

Table 2　Primer pairs used for the four DNA markers ITS, *rbc*L, *mat*K, and *trn*H-*psb*A

Region	Primers (sequence 5′-3′)
ITS	ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC
*rbc*L	1F: ATGTCACCACAAACAGAAAC 724R: TCGCATGTACCTGCAGTAGC
*trn*H-*psb*A	psbA: GTTATGCATGAACGTAATGCTC trnH: CGCGCATGGTGGATTCACAATCC
*mat*K	390F: CGATCTATTCATTCAATATTTC 1326R: TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT

衡量 DNA 条形码的一个重要指标是“barcode gap”是否存在，即序列的种内变异要足够小而种间变异要足够大，从而在中间形成一个明显的间隔区（Meyer 和 Paulay, 2005）。本文用 Meier 等（2006）的 TaxonDNA 软件结合一般的统计软件构建出能够体现种间、种内的遗传距离的分布频度的柱形图。通过 Wilcoxon 秩和检验来检验序列之间的变异性差异。

用 MEGA 4.0（Tamura 等, 2007）软件计算各 DNA 片段的种内和种间的 Kimura-2-parameter（K2P）成对遗传距离。同时构建单独片段以及片段组合的邻接树（NJ），靴带值以 5 000 次重复运算。参考 Hollingsworth 等（2009）conspecific individuals ‘grouping together’ 原则，即每个种的所有个体都聚为一个单系分支则被认为该种鉴定正确。另外，利用 TaxonDNA（Meier 等, 2006）软件中的“Best match”、“Best close match” 和 “All species barcodes”（简称 BBA 法）对物种的鉴定率进行评估。

本研究中，由于丝须蒟蒻薯（*T. integrifolia*）的样品在所有的 DNA 片段中均聚为 2 个不同的单系分支，为了避免与传统分类混淆，我们在本文中将两个分支处理为丝须蒟蒻薯马来西亚分支和丝须蒟蒻薯西藏分支，连同其余 5 个种（即老虎须，实果蒟蒻薯，水田七，裂叶蒟蒻薯，扇苞蒟蒻薯）对条码进行评价。

2　结果

2.1　PCR 扩增和测序成功率

PCR 扩增和测序成功率存在较大的差异，*trn*H-*psb*A 的扩增效率最高，为 100%，*rbc*L 和 *mat*K 的 PCR 扩增成功率相同，均为 94%，ITS 的 PCR 扩增成功率最低，为 78%（表 3）。PCR 扩增成功的样品其测序率均为 100%。*trn*H-*psb*A，*rbc*L 和 *mat*K 三个叶绿体片段所有种中均能扩增成功，只是个别个体扩增失败。ITS 片段 PCR 扩增成功率低的主要原因是裂叶蒟蒻薯所有样品均扩增失败，尽管我们使用了两对 ITS 引物（ITS5/ITS4 和 ITS1/ITS4），并对 PCR 反应条件进行了优化。

2.2　序列信息

所选用的 4 个 DNA 片段的长度、变异位点等信息见表 3。ITS 片段的矩阵长度包括 740 个位点，其中含有 181 个变异位点（24.5%）和 6 个插入/缺失位点，老虎须所有样品在 106 ~ 110 位点处的有一个 4 bp 的插入/缺失；*trn*H-*psb*A 片段的矩阵则包括 349 个位点，其中 22 个为变异位点，还包括 4 个插入/缺失位点，而这 4 个插入/缺失位点均为种特有位点，其中丝须蒟蒻薯的马来西亚居群在 54 ~ 61 位点含有一个 8 bp 的缺失，裂叶蒟蒻薯在 117 ~ 126 位点有一个 10 bp 的插入，水田七在 132 ~ 142 位点有一个 11 bp 的缺失，裂叶蒟蒻薯在 144 ~ 150 位点含有一个 7 bp 的插入；*mat*K 基因的矩阵长度为 742 个位点，包括了 62 个变异位点（8.36%）和 1 个 6 bp 插入/缺失位点，这个插入/缺失位点为丝须蒟蒻薯马来西亚居群特有；*rbc*L 基因的序列长度在种间无差异，均为 651 bp，其矩阵中仅含有 10 个变异位点（1.54%）。在 4 个 DNA 片段中，

表 3　基于“条码分类”的 7 个种的 4 个片段的 PCR，测序，变异位点信息

Table 3　Summary of PCR, sequencing success and variability of the 4 DNA barcode regions. The species resolution, intraspecific and interspecific distance was caculated based on the 7 barcode “taxon” names (mean±SE)

Region	PCR Success/%	Sequencing Success/%	No. of Variable sites/%	Indels (length)	Aligned length/bp	Intraspecific K2P-distance	Interspecific K2P-distance
*trn*H-*psb*A	36(100)	100	22 (6.30)	4 (7, 8, 10, 11)	349	0.0010±0.0004	0.0138±0.0028
*rbc*L	34(94)	100	10 (1.54)	0	651	0.0005±0.0003	0.0049±0.0008
*mat*K	34(94)	100	62 (8.36)	1 (6)	742	0.0017±0.0010	0.0223±0.0027
ITS	28(78)	100	181 (24.5)	6 (1-4)	740	0.0033±0.0018	0.0903±0.0165

种内遗传距离均明显小于种间遗传距离;ITS 片段具有最大的种内遗传距离和种间遗传距离,其次为 *mat*K 和 *trn*H-*psb*A,而 *rbc*L 则具有最小的种内遗传距离和种间遗传距离(表3)。

2.3 DNA Barcode gap 的评估及种间种内差异的统计学检验

从4个DNA片段种间和种内遗传变异的分布图可以看出(图1),ITS片段除了2.0%~2.5%处稍有重叠外,种内变异和种间变异之间的界限明显,表明存在明显的"barcode gap";但是三个叶绿体片段 *mat*K、*trn*H-*psb*A、*rbc*L 的种内和种内遗传变异的分布并不存在"barcode gap"(图1)。

利用Wilconxon秩和检验对不同序列种内种间的变异性进行统计分析,结果表明ITS序列具有最大的种间分异率,而 *rbc*L 具有最小的种间分异率,其种间的分异率依次为 ITS > *mat*K > *trn*H-*psb*A>*rbc*L(表4);而4个DNA片段的种内变异不存在显著性差异(表5)。

2.4 物种分辨率

本文采用Tree-based和BBA两种方法对蒟蒻薯属的物种鉴定率进行了分析。基于Tree-based方法中,在基于单个片段的NJ树中,ITS表现最好(图2:B),可以区分所有6个种(因裂叶蒟蒻薯扩增失败没有获得ITS序列),*mat*K 可以区分7个种中的5个种(71.43%),*trn*H-*psb*A 可分辨7个种中的4个种(57.14%),*rbc*L 鉴定能力最差,只能区分7个种中的3个种(42.86%)(表6)。片段组合中除了 *rbc*L+*trn*H-*psb*A(57.14%)

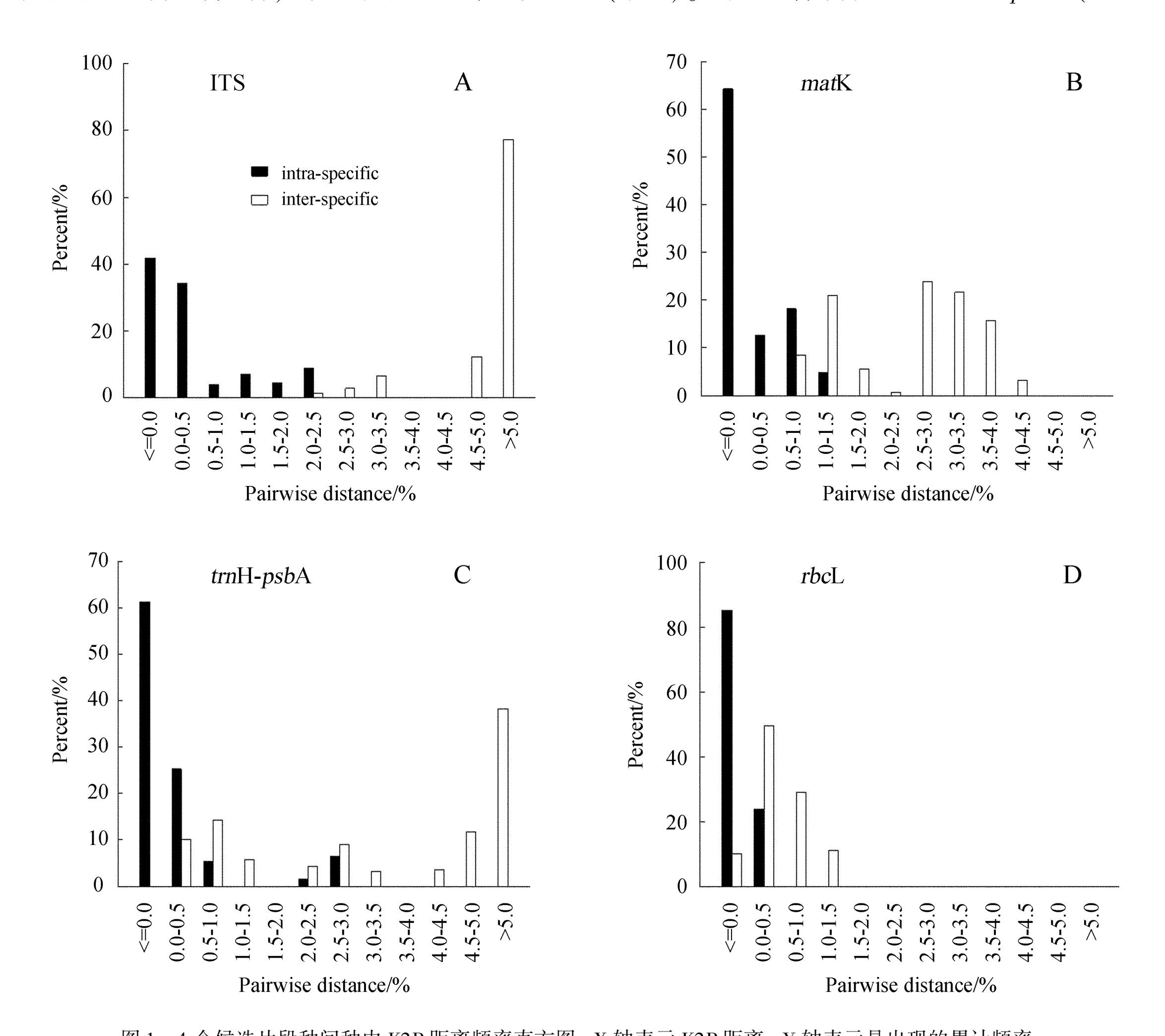


图1 4个候选片段种间种内K2P距离频率直方图. X轴表示K2P距离,Y轴表示是出现的累计频率

Fig. 1 The frequency distribution of inter- and intra-specific Kimura 2-parameter (K2P) distances for 4 candidate regions. The X axis relates to the K2P distances, and the Y axis corresponds to the number of occurrences

表 4　4 个候选序列种间变异的 Wilcoxon 秩和检验

Table 4　Wilcoxon signed rank tests of the inter-specific divergence among the 4 candidate regions

W+	W-	Relative Ranks, n, *P* value	Result
ITS	*rbc*L	W+=20, W-=190, N=20, *P*<=0.0007076	ITS>*rbc*L
ITS	*trn*H-*psb*A	W+=36, W-=195, N=21, *P*<=0.006035	ITS>*trn*H-*psb*A
ITS	*mat*K	W+=42, W-=189, N=21, *P*<=0.01117	ITS>*mat*K
*rbc*L	*mat*K	W+=1, W-=230, N=21, *P*<=7.424e-05	*mat*K>*rbc*L
*rbc*L	*trn*H-*psb*A	W+=208, W-=23, N=21, *P*<=0.001385	*trn*H-*psb*A>*rbc*L
*mat*K	*trn*H-*psb*A	W+=10, W-=221, N=21, *P*<=0.0002628	*mat*K>*trn*H-*psb*A

表 5　4 个候选序列种内变异的 Wilcoxon 秩和检验

Table 5　Wilcoxon signed rank tests of the intra-specific divergence among the 4 candidate regions

W+	W-	Relative Ranks, n, *P* value	Result
ITS	*rbc*L	W+=15, W-=0, N=5, *P*<=0.0625	ITS=*rbc*L
ITS	*trn*H-*psb*A	W+=18, W-=3, N=6, *P*<=0.1562	ITS=*trn*H-*psb*A
ITS	*mat*K	W+=12, W-=3, N=5, *P*<=0.3125	ITS=*mat*K
*rbc*L	*mat*K	W+=1, W-=5, N=3, *P*<=0.5	*mat*K=*rbc*L
*rbc*L	*trn*H-*psb*A	W+=0, W-=15, N=5, *P*<=0.0625	*trn*H-*psb*A=*rbc*L
*mat*K	*trn*H-*psb*A	W+=9, W-=6, N=5, *P*<=0.8125	*mat*K=*trn*H-*psb*A

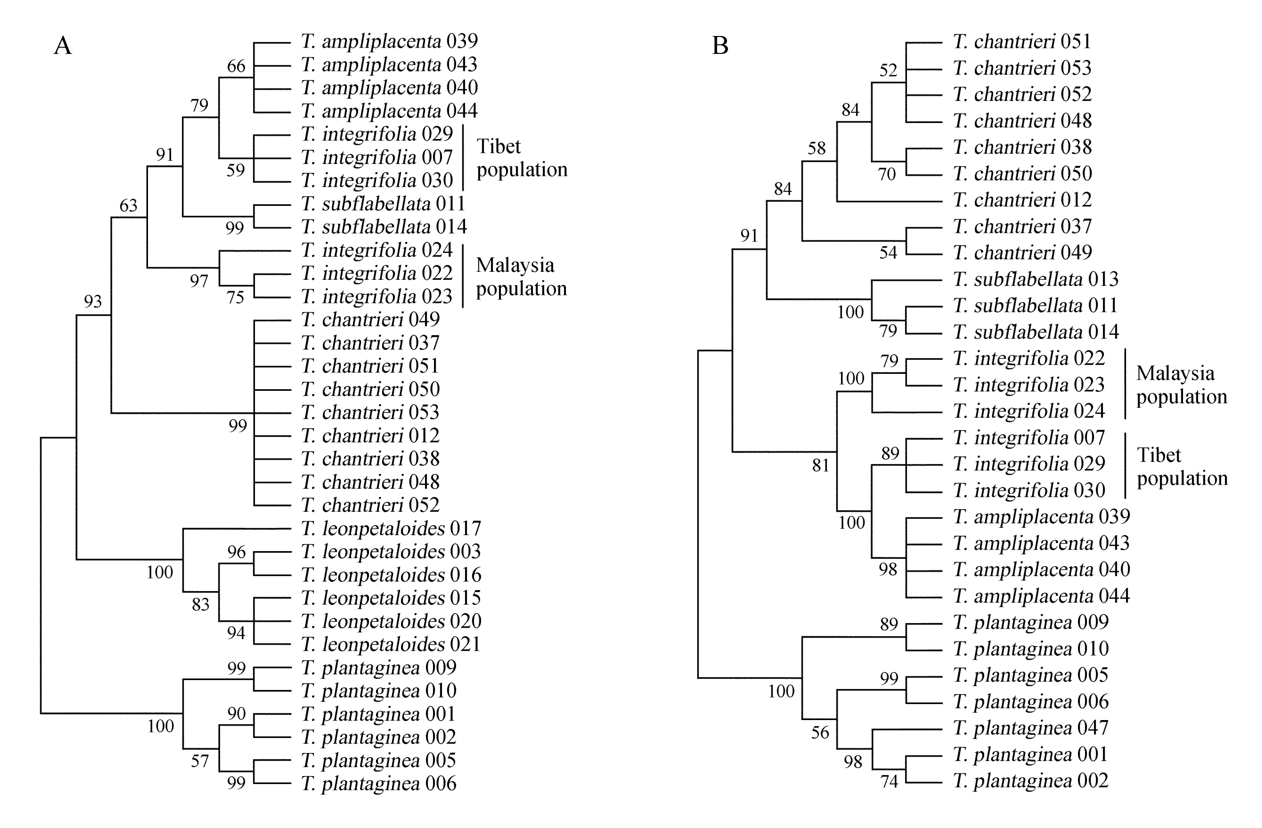


图 2　基于 K2P 距离的叶绿体 *mat*K+*rbc*L 联合矩阵（A） 和核基因 ITS（B） 得到的无根 NJ 树（分支上显示高于 50% 支持率）

Fig. 2　Unrooted neighbour-joining (NJ) tree based on the K2P-distance of cpDNA *mat*K+*rbc*L (A) and nrDNA ITS (B) used, Bootstrap values over 50% were shown above the branches

表6　基于“Tree-based”和“best match”，“best close match”，“all species barcodes”的鉴定成功率

Table 6　Identification successes（%）based on“Tree-based” and“best match”，“best close match”，“all species barcodes”

Region	Tree-based	BBA										
		Best match			Best close match				All species barcodes			
	Ps	SI	AI	MI	SI	AI	MI	NM	SI	AI	MI	NM
ITS	100	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
*rbc*L	42.86	41.17	58.82	0	41.17	58.82	0	0	100	0	0	0
*mat*K	71.43	79.41	20.85	0	79.41	20.85	0	0	88.23	11.76	0	0
*trn*H-*psb*A	57.14	63.88	36.11	0	63.88	36.11	0	0	91.66	8.33	0	0
ITS+*rbc*L	100	100	0	0	100	0	0	0	92.59	7.4	0	0
ITS+*mat*K	100	100	0	0	100	0	0	0	92.59	7.4	0	0
ITS+*trn*H-*psb*A	100	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
*mat*K+*rbc*L	100	100	0	0	100	0	0	0	93.93	6.06	0	0
*mat*K+*trn*H-*psb*A	71.43	100	0	0	100	0	0	0	94.11	5.88	0	0
*rbc*L+*trn*H-*psb*A	57.14	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
ITS+*rbc*L+*mat*K	100	100	0	0	100	0	0	0	92.59	7.4	0	0
ITS+*rbc*L+*trn*H-*psb*A	100	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
ITS+*mat*K+*trn*H-*psb*A	100	100	0	0	100	0	0	0	92.59	7.4	0	0
*mat*K+*trn*H-*psb*A+*rbc*L	100	100	0	0	100	0	0	0	93.93	6.06	0	0
*mat*K+*trn*H-*psb*A+*rbc*L+ ITS	100	100	0	0	100	0	0	0	92.59	7.4	0	0

注：成功鉴定（SI）；模糊鉴定（AI）；鉴定失败（MI）；没有匹配（NM）；物种作为单系的鉴定成功率（Ps）

Note：SI：successful identification；AI：ambiguous identification；MI：misidentification；NM：no match；Ps：percentages of species resolved as unique clusters

和 *mat*K+*trn*H-*psb*A（71.43%）外，其余所有条码组合的鉴定率均为100%（表6）；BBA检验法中，单独片段在“best match”和“best close match”模式中表现为ITS最高，为100%，即所有序列均可鉴定到种，*mat*K为79.41%，*trn*H-*psb*A为63.88%，*rbc*L最小，为41.17%，所有片段组合均为100%，其中 *mat*K+*trn*H-*psb*A和 *rbc*L+*trn*H-*psb*A结果比基于Tree-based鉴定率更高，在“all species barcodes”模型中，单独片段 *mat*K最小，为88.23%，片段组合中ITS+*trn*H-*psb*A、*rbc*L+*trn*H-*psb*A、ITS+*rbc*L+*trn*H-*psb*A为100%，其他组合都在90%以上（表6）。

3　讨论

3.1　DNA条形码的评价

DNA片段引物通用性是条形码评价的重要标准之一（Kress等，2005；Hollingsworth等，2009；CBOL Plant Working Group，2009）。本研究选用的4个DNA片段中，*trn*H-*psb*A引物的通用性（PCR扩增和测序成功率）表现最好，为100%；*rbc*L和 *mat*K各有少量样品扩增失败，PCR扩增效率均为94%，这可能是因为样品的DNA模板的质量较差或实验技术方面的问题。ITS的PCR扩增通用性最低，为78%，主要是因为裂叶蒟蒻薯8个样品中均扩增失败，这可能是因为该种在引物区核苷酸发生突变所导致（Liu等，2011）。所有PCR扩增成功的样品均能成功测序。

ITS序列具有最大的种间分异率，*mat*K次之，*rbc*L具有最小的种间分异率；而4个DNA片段的种内变异无著性差异。通过对种内和种间遗传变异分布的分析，ITS具有明显的“barcode gap”，物种分辨率为100%，而叶绿体片段 *mat*K、*trn*H-*psb*A和 *rbc*L的“barcode gap”不明显，除 *mat*K外，*trn*H-*psb*A和 *rbc*L的物种分辨率均较低。因此，在物种分辨率方面ITS片段作为DNA条码具有明显的优势，但其较低的引物通用性可能是其作为该属DNA条形码的主要限制因素；*mat*K的变异虽然小于ITS，但其高的引物通用性和较高的物种鉴别率可作为该属的DNA条码或条码组合的一部分。*trn*H-*psb*A序列长度变异较大，含有多个插入/缺失位点，可能会对序列比对造成困难（Hollingsworth等，2009），但利用好插入/缺失位点会帮助对物种的

鉴定（Kress 和 Erickson，2007；Liu 等，2011），*trn*H-*psb*A 在单独或片段组合中较低的物种分辨率，可能不适合作为该属的 DNA 条码，尽管其通用性最高。*rbc*L 序列在 4 个 DNA 片段中变异最少，物种鉴别率也最低，但该片段通用性较高且容易排序，并且在部分片段组合中具有较高的物种分辨率，因此可作为条码组合中的一个候选条码。

3.2 蒟蒻薯属的物种分辨率

Tree-based 方法中，单片段鉴定能力为 ITS>*mat*K>*trn*H-*psb*A>*rbc*L，ITS 可以鉴别所有的 6 个种，而 *rbc*L 的物种鉴别率为 42.86%。在片段组合中，除 *rbc*L+*trn*H-*psb*A 和 *mat*K+*trn*H-*psb*A 组合分别能分辨 57.14% 和 71.43% 的物种外，其它条码组合的物种分辨率均为 100%。CBOL 植物工作组（2009）推荐 *mat*K+*rbc*L 组合作为陆地植物的核心条码，物种分辨率可达 72%。在本研究中，*mat*K+*rbc*L 组合可以区分本文中蒟蒻薯属所有的种，物种鉴定率为 100%，可作为该种植物的鉴定的标准条码。虽然在所有含有 ITS 片段的组合条码的物种分辨率也均为 100%，但由于 ITS 在裂叶蒟蒻薯中不能扩增，导致该种在使用 ITS 时不能有效鉴定。如果能解决 ITS 在裂叶蒟蒻薯中 PCR 扩增的技术瓶颈，那 ITS 单个片段或与其它条码（如 *mat*K 和 *rbc*L 等）的组合也可以作为该属物种的标准条码。由于 *mat*K+*rbc*L 具有三条码组合和四条码组合相同的物种鉴定效率，因此，我们推荐 *mat*K+*rbc*L 组合作为蒟蒻薯属植物鉴定的标准条码。

3.3 丝须蒟蒻薯新种的发现

DNA 条形码技术是形态分类的重要辅助工具之一，除帮助鉴定现有的物种外，还能发现一些新的物种或隐种（Newmaster 和 Ragupathy，2009；Valentini 等，2009）。由于蒟蒻薯属植物同一种的不同居群在各自特殊的生境和气候地理环境的影响下，有些形态或遗传结构已经发生了变化，在物种的形态鉴定上缺乏稳定的性状（张玲等，2006），因此，仅依靠形态特征来鉴定物种具有一定的困难，需要用 DNA 条形码的方法结合形态特征来重新评估现有物种的分类地位。

本研究中，基于形态性状承认的老虎须，实果蒟蒻薯，扇苞蒟蒻薯，水田七，裂叶蒟蒻薯 5 个种各自均能形成单系分支，得到了 DNA 条形码很好的区分（图 2：A、B）。而丝须蒟蒻薯的样品并没有形成单系分支，而是被分成两个独立的单系分支，即采自马来西亚居群的丝须蒟蒻薯马来西分支和采自西藏居群的丝须蒟蒻薯西藏分支（图 2）。ISSR 分析结果表明，丝须蒟蒻薯的西藏居群和马来西亚居群间存在显著的遗传分化（张玲等，2006），它们可能已分化形成了两个不同的遗传实体。从分布范围来看，丝须蒟蒻薯分布的范围较广，从巴基斯坦、斯里兰卡、印度东北部、柬埔寨、老挝、缅甸、泰国、越南至西马来西亚、印度尼西亚群岛均有分布，且南北有很大的地理隔离（Drenth，1972）。在我国仅分布在西藏东南部的雅鲁藏布江河谷内，位于热带雨林的北部的极限，但由于南北走向的河谷和其中的高山，形成了热带性质的局部小气候（张玲等，2006），这种与中心分布区长期隔离势必会造成遗传结构的分化（Hewitt，2000）和形态的变异。丝须蒟蒻薯的西藏居群和马来西亚居群在形态上也存在一定的差异，如西藏居群的大苞片颜色为白色，下部略紫，而马来西亚居群的大苞片为黑紫色；二者花期也不同，西藏居群为 8-9 月，而马来西亚居群为 5-6 月。综合分析，我们认为丝须蒟蒻薯西藏居群很可能是一个新种，但还需要更详细的形态学证据对其分类学地位进行评价。本文的结果对于蒟蒻薯属植物的保护和分类学的认识具有重要的作用。

致谢 中国西南野生生物种质资源库分子生物学实验中心的杨俊波、李洪涛老师以及 DNA 条形码小组的各位同学在实验和数据处理过程中给予了很多技术指导，高连明老师在文章写作及修改过程中提出了大量的宝贵意见和建议。

〔参 考 文 献〕

傅立国，金鉴明，1992. 中国植物红皮书-稀有濒危植物（第 1 册）［M］. 北京：科学出版社

贾敏如，李星炜，2005. 中国民族药志要［M］. 北京：中国医药科技出版社

凌萍萍，1985. 中国植物志［A］. 中科院中国植物志编辑委员会［M］. 北京：科学出版社，**16**：42—54

张玲，2006. 蒟蒻薯科植物的系统学、物种生物学与进化生态学研究［D］. 昆明：中国科学院昆明植物研究所（博士学位

论文)

CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**: 12794—12797

Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM *et al*., 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, **56** (2): 295—299

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M *et al*., 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360** (1462): 1889—1895

Cowan RS, Chase MW, Kress WJ *et al*., 2006. 300 000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants [J]. *Taxon*, **55** (3): 611—616

Doyle J, Doyle J, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemistry*, **19**: 11—15

Drenth E, 1972. A revision of the family Taccaceae [J]. *Blumea*, **20** (2): 367—406

Grierson M, Green PS, 1996. *A Hawaiian Florilegium: Botanical Portraits from Paradise* [M]. Hawai'i: University of Hawai'i Press, 70

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al*., 2003. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **270** (1512): 313—321

Hewitt G, 2000. The genetic legacy of the Quaternary iceages [J]. *Nature*, **405**: 907—913

Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL *et al*., 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9** (2): 439—457

Jarman SN, Elliott NG, 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, **13** (4): 624—633

Knowlton N, 1993. Sibling species in the sea [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**: 189—216

Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, **2** (6): e508

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA *et al*., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102** (23): 8369—8374

Lahaye R, Van der Bank M, Bogarin D *et al*., 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** (8): 2923—2928

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP *et al*., 2007. Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, **23** (21): 2947—2948

Liu J, Möller M, Gao LM *et al*., 2011. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus* L., Taxaceae) and the discovery of cryptic species [J]. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 89—100

Meier R, Kwong S, Vaidya G *et al*., 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success transactions [J]. *Systematic Biology*, **55**: 715—728

Meyer CP, Paulay G, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biology*, **3** (12): 2229—2238

Newmaster SG, Ragupathy S, 2009. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae) [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9** (s1): 172—180

Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596—1599

Tautz D, Arctander P, Minelli A *et al*., 2002. DNA points the way ahead of taxonomy - In assessing new approaches, it's time for DNA's unique contribution to take a central role [J]. *Nature*, **418**: 479—479

The Angiosperm Phylogeny Group, 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141**: 399—436

Valentini A, Pompanon F, Taberlet P, 2009. DNA barcoding for ecologist [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, **24** (2): 110—117

Zhang L (张玲), Li QJ (李庆军), Li DZ (李德铢), 2006. Genetic diversity of *Tacca integrifolia* (Taccaceae) in the Brahmaputra valley, Tibet [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **14** (1): 65—72